



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS - CFM
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**ESTUDO, POR MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA E TENSÃO
SUPERFICIAL, DA INTERAÇÃO ENTRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS
E PIRENO EM MEIO AQUOSO**

JAQUELINE ALVES

ORIENTADORA:
PROF^a. DR^a. MARIA MARTA DE SOUZA SIERRA

Florianópolis, novembro de 2008

JAQUELINE ALVES

**ESTUDO, POR MEDIDAS DE FLUORESCÊNCIA E TENSÃO
SUPERFICIAL, DA INTERAÇÃO ENTRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS
E PIRENO EM MEIO AQUOSO**

Trabalho de Conclusão de Curso de Química
Bacharelado, executado durante o semestre
de 2008.2. Disciplina QMC 5512 – Estágio II,
como requisito parcial para obtenção do grau
de Bacharel em Química.

Coordenador de Estágio: Prof^o. Dra Inês
Maria Costa Brighente

Orientadora do Estágio: Prof^a. Dr^a. Maria
Marta de Souza Sierra.

Florianópolis / SC

Semestre 2008.2.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, principalmente, pelo incentivo, apoio e amor em todos os momentos. Ao meu Pai, que mesmo sem dizer muitas palavras torcia por mim. Aos meus irmãos Luiz Alberto e Ana Keila, Mariana e Morgana por todo o apoio e amor.

Ao meu noivo Alisson, pelo amor e pela ajuda em todos os momentos, e que esteve ao meu lado me incentivando principalmente a nunca desistir.

À Prof^a Maria Marta de Souza Sierra pela orientação, incentivo, paciência, dedicação e a oportunidade de realizar este trabalho.

Aos meus amigos, Luciana, Luiza, Édna, Rodrigo, Ricardo, Michelle, Ana, Andressa, Melina, Fabíola, Lígia, Nataly, por todo o apoio, carinho e amizade.

Aos colegas do laboratório 214 e 216, Evandro, Nani, Vanessa, Cris, Luiz, Cris, Josi, Morgana, Rafael, César, Isadora e Bruno pela ajuda e amizade.

Ao Luciano Tormen, pela paciência e apoio.

Aos amigos dos laboratórios 205 e 305, em especial o Samuel, Renato e Ismael pela ajuda e empréstimo de equipamentos.

À todos os professores que participaram da minha formação acadêmica.

À prof^a Tereza Cristina, que sempre me deu força para continuar.

À Universidade Federal de Santa Catarina, e ao Departamento de Química pela oportunidade.

Enfim, a Deus por tudo.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
SUMÁRIO.....	4
LISTA DE FIGURAS	6
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO.....	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Origem e Classificação das Substâncias Húmicas	11
1.2. Importância das Substâncias Húmicas	11
1.3. Estrutura das Substâncias Húmicas	12
1.4. Interações entre Substâncias Húmicas e Compostos Orgânicos	14
1.5. Propriedades das Substâncias Húmicas em Solução.....	14
1.5.1. Tensoatividade (TS).....	14
1.5.2. Espectroscopia de Fluorescência	16
1.6. Reatividade das Substância Húmicas	17
1.6.1. Método da Supressão de Fluorescência na Determinação de K_{CO} entre Substâncias Húmicas e Compostos Apolares	17
2. OBJETIVOS	20
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	21
3.1. Origem e Preparo das Amostras.....	21
3.2. Materiais	22
3.2.1. Reagentes e Solventes.....	22
3.3. Caracterização Elementar e Espectroscópica	22
3.4. Medidas de Fluorescência	22
3.5. Medidas de Tensão Superficial.....	22
3.6. Preparo das Soluções de Substâncias Húmicas	23
3.7. Determinação das Constantes de Associação SH – Pireno (K_{CO})	23
3.8. Preparo das Soluções do Surfactante Dodecilsulfato de Sódio (SDS)	23
3.9. Parâmetros para as Medidas de Fluorescência das SH e SDS.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25

4.1. Análise Elementar.....	25
4.2. Espectroscopia de Infravermelho.....	26
4.3. Espectroscopia de Fluorescência	27
4.4. Constantes de Associação SH – Pireno	32
5. CONCLUSÕES	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
7. ANEXOS	43
a. Medidas de Fluorescência para a amostra de solo (AH Horto 1).	43
b. Medidas de Fluorescência para a amostra de solo (AH Horto 2).	44
c. Medidas de Fluorescência para a amostra de solo (AF Horto 1).....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo bidimensional para a estrutura dos AH.....	12
Figura 2: Modelo tridimensional para a estrutura de ácidos húmicos.....	13
Figura 3: Modelos estruturais de “Building blocks” para os AH.....	13
Figura 4: Estrutura do surfactante Dodecilsulfato de Sódio – SDS.....	15
Figura 5: Estrutura química do pireno.....	18
Figura 6: Etapas envolvidas no processo de extração e purificação das SH.....	21
Figura 7: Espectros de Infravermelho para as amostras de AH e AF estudadas.....	26
Figura 8: Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 313 \text{ nm}$) para a amostra AF Horto1, em diferentes concentrações.	29
Figura 9: Variação da intensidade de fluorescência e do $\lambda_{m\acute{a}x}$ em função da concentração, para a amostra AF Horto 1.....	29
Figura 10: Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 313 \text{ nm}$) para a amostra AH Horto1, em diferentes concentrações.....	30
Figura 11: Variação da intensidade de fluorescência e do $\lambda_{m\acute{a}x}$ em função da concentração, para a amostra AH Horto 1.....	30
Figura 12: Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 313 \text{ nm}$) para a amostra AH Gran7, em diferentes concentrações.....	31
Figura 13: Variação da intensidade de fluorescência e do $\lambda_{m\acute{a}x}$ em função da concentração, para a amostra AH Gran 7.....	31
Figura 14: Espectro de SF do pireno ($10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de AH Gran7.....	33
Figura 15: Gráfico de Stern – Volmer para o sistema Pireno - AH de estuário (Gran 7).	35
Figura 16: Intensidade de fluorescência do pireno ($10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) em função da concentração de SDS.	36
Figura 17: Determinação da CMC do SDS à temperatura ambiente.....	37
Figura 18: SF do pireno ($10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de AH Horto 1 (0 à 60 mg L^{-1})..	43
Figura 19: Gráfico de Stern – Volmer para o sistema Pireno - AH de solo (Horto 1).	44
Figura 20: SF do pireno ($10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de AH Horto 2 (0 à 60 mg L^{-1})..	44
Figura 21: Gráfico de Stern – Volmer para o sistema Pireno - AH de solo (Horto 2).	45

Figura 22: SF do pireno (10^{-7} mol L⁻¹) na presença de AF Horto 1 (0 à 60 mg L⁻¹)...46

Figura 23: Gráfico de Stern – Volmer para o sistema Pireno - AF de solo (Horto 1).

.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise Elementar das SH estudadas.....	25
Tabela 2: Interação do Pireno com AH Gran 7 (estuário).....	34
Tabela 3: Constantes de Associação entre o Pireno e as SH estudadas.....	35
Tabela 4: Interação do Pireno com AH Horto 1.	43
Tabela 5: Interação do Pireno com AH Horto 2.	45
Tabela 6: Interação do Pireno com AF Horto 1.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	ácido fúlvico
AF Horto 1	ácido fúlvico Horto Florestal 1
AH Gran 7	ácido húmico Manguezal de Ratores 7
AH Horto 1	ácido húmico Horto Florestal 1
AH Horto 2	ácido húmico Horto Florestal 2
Abs _{em}	absorbância no comprimento de onda de emissão
Abs _{ex}	absorbância no comprimento de onda de excitação
CO	carbono orgânico
CMC	concentração micelar crítica
C _{pi}	concentração total de pireno
EFI	efeito de filtro interno
F _{obs}	fluorescência observada
F _{corr}	fluorescência corrigida
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IHSS	Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas
IV	Infravermelho
K _b	constante de Stern - Volmer
K _{CO}	constante de Stern - Volmer normalizada ao conteúdo de carbono orgânico
MO	matéria orgânica
Pi	pireno
Pi-SH	pireno associado a substância húmica
SDS	dodecilsulfato de sódio
SH	substância húmica
TS	tensão superficial
λ_{exc}	comprimento de onda de excitação
λ_{em}	comprimento de onda de emissão

RESUMO

As substâncias húmicas (SH) são os principais componentes da fração orgânica em águas, sedimentos e solos. São produtos da decomposição da matéria orgânica (MO) animal e vegetal, possuem elevadas massas molares com diferentes grupos funcionais e são responsáveis por processos físicos, químicos e biológicos nestes ambientes. Dentre os processos biogeoquímicos nos quais as SH estão envolvidas, está a solubilização de poluentes apolares, principalmente os HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) em águas naturais. Neste trabalho, foi utilizado o pireno, como modelo de HPA, para investigar a força e a natureza destas interações.

As substâncias húmicas (ácidos fúlvicos – AF e ácidos húmicos – AH) estudadas provieram de solo (Horto 1 e Horto 2) e sedimento estuarino (Gran 7) e foram caracterizados por meio de análise elementar (CHNS) e infravermelho (IV), mostrando as propriedades típicas deste tipo de material.

As constantes de associação (K_{CO}) entre o pireno e as amostras de AF e AH, foram medidas pelo método de supressão de fluorescência (SF) utilizando as equações de Stern - Volmer. Os valores encontrados foram: 24,83 (AH Gran 7); 7,40 (AH Horto 1); 3,46 (AH Horto 2) e 17,22 (AF Horto 1).

Para verificar se a supressão de fluorescência poderia ser consequência da inserção do pireno em microambientes tipo micelares nas soluções de SH, foram feitos experimentos utilizando um surfactante (dodecilsulfato de sódio - SDS) com concentração micelar crítica (CMC) conhecida.

Os dados sugerem, que o mecanismo de supressão de fluorescência do pireno pelas SH, envolve outros fatores que não a simples inclusão do primeiro em ambientes pseudo-micelares.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Origem e Classificação das Substâncias Húmicas

A matéria orgânica (MO) é amplamente encontrada nos solos, águas e sedimentos. Consiste de um sistema complexo de substâncias, de origem animal e vegetal, em vários estágios de decomposição, resultantes de fatores biológicos, químicos e físicos.

A MO pode ser dividida em dois grupos fundamentais. O primeiro, é constituído por produtos da decomposição dos resíduos orgânicos e do metabolismo microbiano, tais como: proteínas, aminoácidos, carboidratos, ácidos graxos entre outros. Estas substâncias constituem cerca de 10 a 15 % da reserva total de carbono orgânico (CO), e são denominadas *substâncias não húmicas*. O segundo grupo, é representado pelas *substâncias húmicas (SH)* e constituem cerca de 85 a 90 % da reserva total de carbono orgânico (Santos e Camargo, 1999).

As substâncias húmicas são polidispersas, possuem elevadas massas molares e uma variedade de grupos funcionais. Com base na sua solubilidade em água, são classificadas em:

- *Ácidos Húmicos (AH)*: consistem na fração das SH solúvel em água, em pHs básicos apresentando coloração escura;
- *Ácidos Fúlvicos (AF)*: consistem na fração das SH solúvel em água, em qualquer pH. São mais solúveis por apresentarem menor massa molar e maior número de grupamentos ácidos que os AH e apresentam uma coloração mais clara que os AH.
- *Humina*: é a fração insolúvel em água, em qualquer condição de pH. Existem poucos estudos sobre esta fração.

1.2. Importância das Substâncias Húmicas

As SH desempenham um papel importante para o meio ambiente. Considerando os aspectos físicos nos solos, por exemplo, contribuem para a retenção de calor estimulando a germinação de sementes, atuam contra a erosão cimentando as partículas em agregados, e aumentam a permeabilidade do meio (Lobartini *et al.*, 1992; Kordel *et al.*, 1997). Já, em relação aos aspectos químicos, a presença de grupos funcionais, como carboxilas e hidroxilas fenólicas, faz com que as SH

apresentem um comportamento polieletrólítico e atuem como agentes tamponantes de íons metálicos (Saar e Weber, 1982; Alloway, 1990).

Em ambientes aquáticos, as SH podem, por exemplo, alterar a partição dos metais passíveis de complexação, seqüestrando ou liberando estes íons para a solução. Os AH dissolvidos podem, ainda, facilitar a remoção de contaminantes orgânicos da água por processos de complexação e floculação (Rebhun *et al.*, 1996 e 1998).

A toxicidade dos hidrocarbonetos (HPAs) é bastante conhecida, entretanto, pouco se conhece sobre suas interações com a MO nestes ambientes. Sendo as SH os componentes majoritários desta MO é interessante que estas interações sejam investigadas, de modo que os fatores que influenciam sua mobilidade, biodisponibilidade e toxicidade possam ser esclarecidas.

1.3. Estrutura das Substâncias Húmicas

Há algum tempo, acreditava-se que os AH eram constituídos principalmente de estruturas aromáticas. Mais recentemente, (Stevenson, 1994) verificou que o grau de aromaticidade é bem menor, sendo então, incorporado nestas estruturas porções alifáticas. (Figura 1).

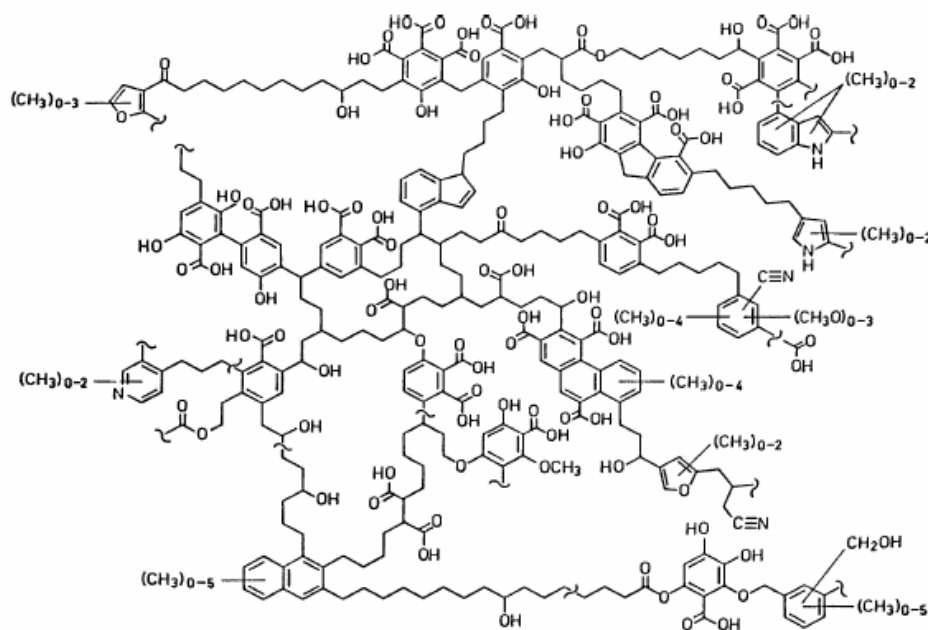


Figura 1: Modelo bidimensional para a estrutura dos AH (Shulten e Shnitzer, 1993).

Nos últimos anos, tem sido proposto um modelo de estrutura química dos AH que

mostra que elas contêm, em solução, espaços vazios de diferentes tamanhos, onde podem alojar-se compostos orgânicos, hidrofílicos ou hidrofóbicos, como carboidratos, lipídios, agrotóxicos e outros poluentes, podendo estar presentes também, argilas e óxidos-hidróxidos (Sein *et al.*, 1999).

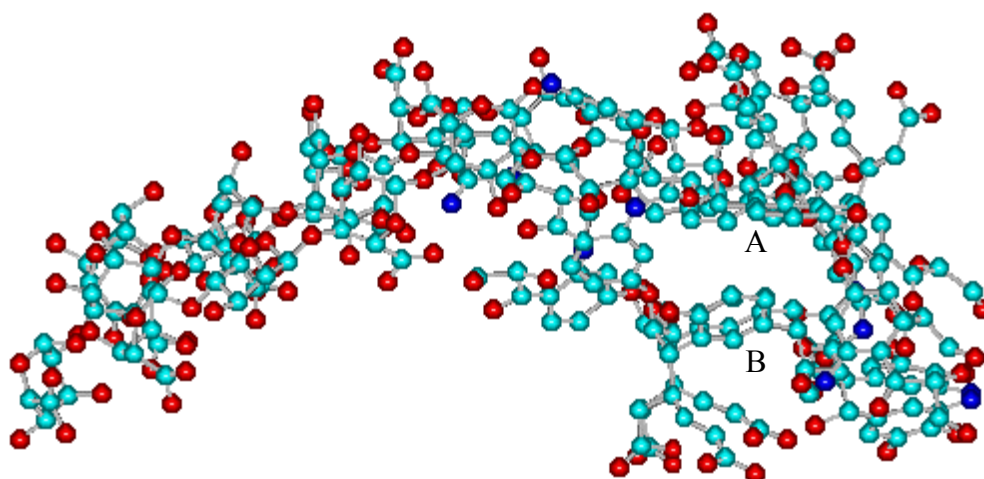


Figura 2: Modelo tridimensional para a estrutura de ácidos húmicos (Sein *et al.*, 1999).

● = carbono, ● = oxigênio, ● = nitrogênio; A e B indicam os vazios provavelmente presentes nas estruturas das SH.

Segundo Steelink *et al.*, 1985, as estruturas dos AH podem ser formadas ainda por associações de moléculas pequenas, denominadas “*building blocks*”, ou seja, blocos construtores, unidos por interações supramoleculares.

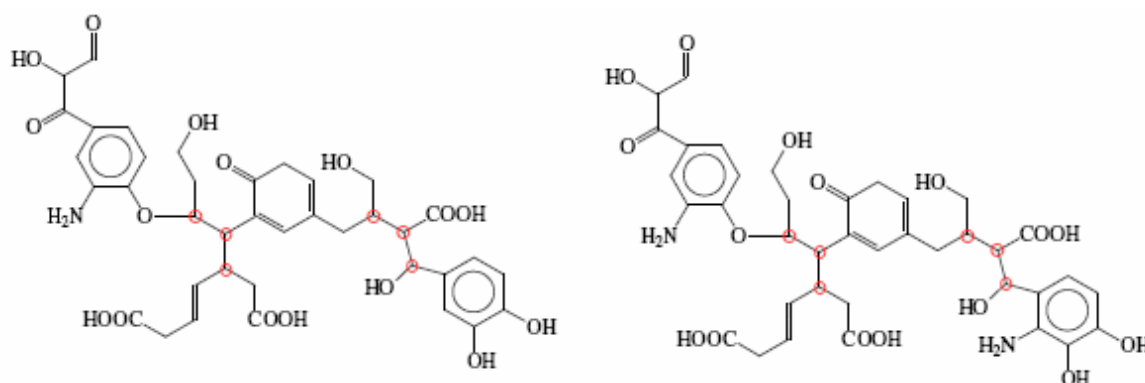


Figura 3: Modelos estruturais de “Building blocks” para os AH.

1.4. Interações entre Substâncias Húmicas e Compostos Orgânicos

A dinâmica e os mecanismos das interações entre SH e moléculas orgânicas dependem das propriedades físico-químicas tanto das últimas, como das primeiras. Estas interações são influenciadas pelas condições do sistema, como a qualidade e quantidade de matéria orgânica, pH, temperatura, potencial redox, umidade e força iônica da solução (Senesi e Felici, 1993). Estudos em ambientes aquosos envolvendo complexação, adsorção, oclusão em espaços vazios das moléculas, partição em microambientes hidrofóbicos, são alguns dos mecanismos considerados, ainda não completamente elucidados (Tavares *et al.*, 1996; Resende, 1997).

Efetivamente, a solubilidade de contaminantes orgânicos como pesticidas, herbicidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em água pode ser aumentada pela presença de SH (Chiou, 1986). Em alguns estudos, os coeficientes de partição (K_{co}) entre o meio aquoso e as SH têm sido avaliados assumindo um modelo micela-soluto (Chiou *et al.*, 1986; Tanaka *et al.*, 1997).

A aromaticidade das SH tem grande importância na captura de poluentes aromáticos em meio aquoso (Tanaka *et al.*, 1997). Além da aromaticidade, a massa molar também é determinante nas interações SH-contaminantes orgânicos. Uma maior massa molar corresponde a um maior número de grupamentos aromáticos, sendo que o aumento do número de ligações de carbono conjugadas aumenta a polidispersidade do substrato húmico e sua habilidade em capturar compostos orgânicos (Chin *et al.*, 1997).

1.5. Propriedades das Substâncias Húmicas em Solução

1.5.1. Tensoatividade (TS)

Surfactantes (ou tensoativos) são compostos que alteram a tensão superficial da água, e podem formar micelas em solução. Estes efeitos se devem ao fato de que os surfactantes são compostos anfífilicos, ou seja, suas moléculas possuem regiões distintas hidrofílicas (polares) e hidrofóbicas (apolares). A região hidrofílica fica em contato com a água enquanto a região hidrofóbica fica em contato com o ar, aumentando assim, a superfície efetiva da solução e então diminuindo a TS da

água. A concentração micelar crítica é a menor concentração onde ocorre a formação de micelas de um surfactante, e estas coexistem em um equilíbrio dinâmico (Montenegro, 1997). As micelas permitem solubilizar os mais variados solutos e espécies poucos solúveis, em quantidade proporcional à concentração do surfactante, desde que essa concentração seja igual ou superior à CMC (Maniasso, 2001).

Dependendo da estrutura química dos surfactantes, estes podem ser classificados em: aniônicos (exemplo: dodecilsulfato de sódio - SDS); catiônicos (exemplo: brometo de dodeciltrimetilamônio - DTAB); não iônicos (exemplo: mono n-dodecil éter tetra-etileno glicol) e zwitteriônico (exemplo: propionato de N-alquil- N,N-dimetil-β-amônio). Neste trabalho foi utilizado o surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS), cuja estrutura é mostrada na Figura 4:

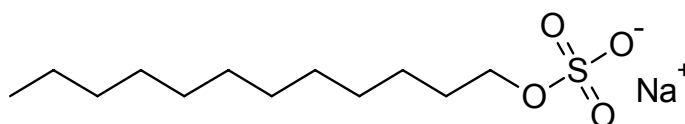


Figura 4: Estrutura do surfactante Dodecilsulfato de Sódio – SDS.

As moléculas de AH e AF contêm grupos polares (hidrofílicos) e grupos apolares (hidrofóbicos) o que lhes confere um caráter tensoativo (Visser e Caillier, 1998). Sua influência no aumento da solubilidade de HPAs em água como dito acima, deve portanto, estar relacionada com esta atividade superficial.

Os estudos sobre SH foram iniciados há longo tempo, mas encontram-se poucos dados na literatura abordando a tensoatividade destas em solução. Yates e von Wandruszka (1997), mostraram a dependência da TS dos AH em solução em relação ao pH e à força iônica, propondo um modelo “pseudomicelar” para explicar os dados encontrados. Sierra *et al.*, (2005), mostraram resultados que levaram à conclusões semelhantes.

1.5.2. Espectroscopia de Fluorescência

Quando uma molécula absorve radiação eletromagnética, a maneira com que ela retorna ao seu estado fundamental é consequência de sua estrutura e de suas propriedades físico-químicas. O caminho de volta ao estado fundamental envolve a emissão de radiação. Durante o retorno, uma parte de energia absorvida é reemitida, sendo este fenômeno conhecido como *luminescência*. Se a energia é reemitida a partir do primeiro estado singlete excitado o fenômeno corresponde à *fluorescência* e o grupo que emite a radiação é denominado *fluoróforo* (Parker, 1968).

A fluorescência de um composto depende da sua estrutura molecular, e está quase sempre associada ao sistema eletrônico π . Estes, ao contrário dos elétrons σ estão mais livres para realizar as transições para estados excitados.

A fluorescência molecular é medida excitando-se a amostra no comprimento de onda de absorção, também conhecido como comprimento de onda de excitação (λ_{exc}), e medindo-se a emissão a um comprimento de onda mais alto denominado comprimento de onda de fluorescência (λ_{em}). Geralmente, a emissão fluorescente é medida em ângulo reto em relação ao feixe incidente para evitar a interferência deste feixe.

A instrumentação para as medidas de fluorescência consiste de uma fonte de luz para excitar a amostra, um monocromador para selecionar o comprimento de onda de excitação, um compartimento para a amostra, um segundo monocromador para isolar e analisar a emissão fluorescente proveniente da amostra, um fotomultiplicador e, em registrador para determinar a intensidade de emissão de fluorescência.

A fluorescência é uma técnica óptica bastante usada para investigar as moléculas, pois o tempo de vida do estado excitado é suficientemente grande para que uma variedade de interações físico-químicas possa ocorrer antes da emissão. É um método simples, muito sensível e não destrutivo, e tem sido utilizado para estudar vários sistemas químicos, físicos e biológicos.

1.6. Reatividade das Substância Húmicas

1.6.1. Método da Supressão de Fluorescência na Determinação de K_{co} entre Substâncias Húmicas e Compostos Apolares

Entre os processos de desativação do estado excitado está a conversão externa ou supressão. A desativação de um estado eletrônico por conversão externa ou supressão de fluorescência (SF) pode envolver a interação e transferência de energia entre a molécula excitada e o solvente e outros solutos (Skoog *et al.*, 2002). Existem três tipos de processos de supressão de fluorescência que podem ocorrer, são eles: *estático* ocorre quando um complexo não fluorescente é formado entre o fluoróforo e o supressor; *dinâmico*, o supressor deve se difundir até o fluoróforo, enquanto este estiver excitado e desativá-lo a um estado não radiante; *aparente* não é exatamente um processo de supressão, pois deve-se à atenuação da radiação por um excesso de concentração do fluoróforo ou pela presença de outras espécies que absorvam em solução. Este fenômeno é chamado de “efeito de filtro interno” (EFI) (Lakowicz, 1983).

As SH são capazes de atenuar a fluorescência de alguns compostos (sondas fluorescentes) em solução aquosa. Estas sondas fluorescentes são substâncias cuja posição das bandas de emissão no espectro de fluorescência depende do solvente. Podem ser chamadas de corantes ou indicadores solvatofluorocrômicos ou fluorossolvatoocrômicos (Reichardt, 1994). As sondas fluorescentes são usadas no estudo de materiais húmicos, porque possuem bandas definidas nos espectros facilitando a interpretação dos dados. Este efeito tem sido usado na determinação das constantes de associação (K_{co}) entre poluentes fluorescentes e SH (Gauthier *et al.*, 1986).

Na maioria dos trabalhos com SH, o pireno (Figura 5) tem sido utilizado como sonda, pois oferece vantagens sobre outros fluoróforos como:

- Possui um forte pico de excitação em 240 nm, onde soluções de SH são fracamente excitadas;
- Pode ser detectado em concentrações na ordem de 10^{-7} mol L⁻¹;
- A razão entre o primeiro e o terceiro pico vibracional do seu espectro de emissão (I_1/I_3) é um bom indicador da polaridade do ambiente percebido por ele (Dong e Winnik, 1982);

- Comparado a outros HPAs possui uma toxicidade relativamente baixa.

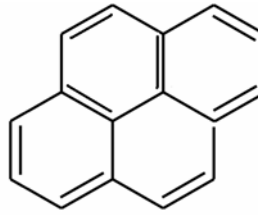
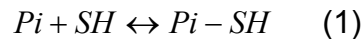


Figura 5: Estrutura química do pireno.

A SF é um método simples e por não depender da separação do poluente livre e ligado, é a técnica mais popular na determinação de constantes de equilíbrio entre poluentes e SH.

Esta técnica da SF por SH é baseada na observação de que a intensidade de fluorescência é proporcionalmente decrescida com a adição de SH. A associação pireno Pi-SH pode ser representada pelas equações a seguir, as quais são simples derivações da equação de Stern - Volmer resultantes da supressão estática (Gauthier *et al.*, 1986).



$$K_b = \frac{[Pi - SH]}{[Pi] \times [SH]} \quad (2)$$

Onde Pi é o pireno, SH é a substância húmica, Pi-SH é o pireno associado a SH e K_b é a constante de associação, sendo que esta quando normalizada ao conteúdo de CO é representada por K_{co} .

O balanço de massa é descrito pela equação 3, onde C_{Pi} é a concentração total de pireno.

$$C_{pi} = [Pi] + [Pi + SH] \quad (3)$$

Combinando as equações 2 e 3 temos:

$$\frac{C_{Pi}}{[Pi]} = 1 + K_b [SH] \quad (4)$$

Assumindo que a intensidade de fluorescência é proporcional à concentração de pireno livre na solução, temos:

$$\frac{F_{corr(inicial)}}{F_{corr}} = 1 + K_b [SH] \quad (5)$$

Onde $F_{corr(inicial)}$ e F_{corr} são as intensidades corrigidas de fluorescência do pireno na ausência e presença de SH, e K_b é a constante de Stern-Volmer, que é dada pelo coeficiente angular de um plote de $F_{corr(inicial)}/F_{corr}$ versus concentração de SH (Gauthier *et al.*, 1986).

Em elevadas concentrações, as SH absorvem uma significativa quantidade da radiação de excitação e emissão, sendo necessário realizar a correção do Efeito de Filtro Interno (EFI), com base na geometria da célula e características da solução, como descrito por Parker na equação 6:

$$\frac{F_{corr}}{F_{obs}} = \frac{2,3dA_{ex}}{1-10^{dA_{ex}}} * 10^{gA_{em}} * \frac{2,3SA_{em}}{1-10^{SA_{em}}} \quad (6)$$

O F_{obs} e F_{corr} são as intensidades de fluorescência observada e corrigida respectivamente. A_{ex} e A_{em} são medidas feitas no espectrofotômetro UV-Vis e correspondem às absorbâncias por centímetro nos comprimentos de onda de excitação (334 nm) e emissão (373 nm) (Parker, 1968). S é a largura do feixe de excitação, g é a distância da lateral do feixe de excitação até a lateral da cubeta e d é o comprimento da lateral da cubeta (MacDonald *et al.*, 1997).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo:

Quantificar e identificar, por meio de medidas de fluorescência e tensão superficial a natureza das interações entre substâncias húmicas (SH) e pireno em meio aquoso.

Para tanto, foram realizadas as seguintes etapas:

- Extração e purificação, segundo a metodologia recomendada pela IHSS, das substâncias húmicas (ácidos húmicos - AH e ácidos fúlvicos - AF) provenientes de sedimentos estuarinos e de solos.
Obs: As amostras já haviam sido obtidas e purificadas em trabalhos anteriores.
- Avaliação da composição química elementar e funcional das frações sólidas de AF e AH, por meio das seguintes técnicas analíticas: análise elementar (CHNS); espectroscopia de infravermelho (IV); absorção UV-VIS.
- Avaliação da influência da concentração nas características de fluorescência e absorção das SH, em solução aquosa.
- Acompanhamento do *quenching* (atenuação) na fluorescência do pireno provocado pela presença de SH, em solução aquosa. Comparação entre este efeito e aquele, eventualmente provocado, por um surfactante conhecido como SDS (dodecilsulfato de sódio).
- Medida (pelo método de Stern-Volmer) das constantes de equilíbrio normalizadas ao conteúdo de carbono orgânico (K_{co}) entre pireno e SH, em solução aquosa.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Origem e Preparo das Amostras

As amostras de SH (AF e AH) terrestres e estuarinas, provieram do Horto Florestal (Horto 1 e Horto 2) e do Manguezal de Ratores (gran 7), respectivamente. Estas, já haviam sido extraídas e purificadas conforme o protocolo recomendado pela IHSS (Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas) (Rauen, 2005; Tormen 2005). No presente trabalho, as amostras foram secas em estufa à 60°C.

As etapas de extração para as amostras de AH e AF são mostradas na figura 6.

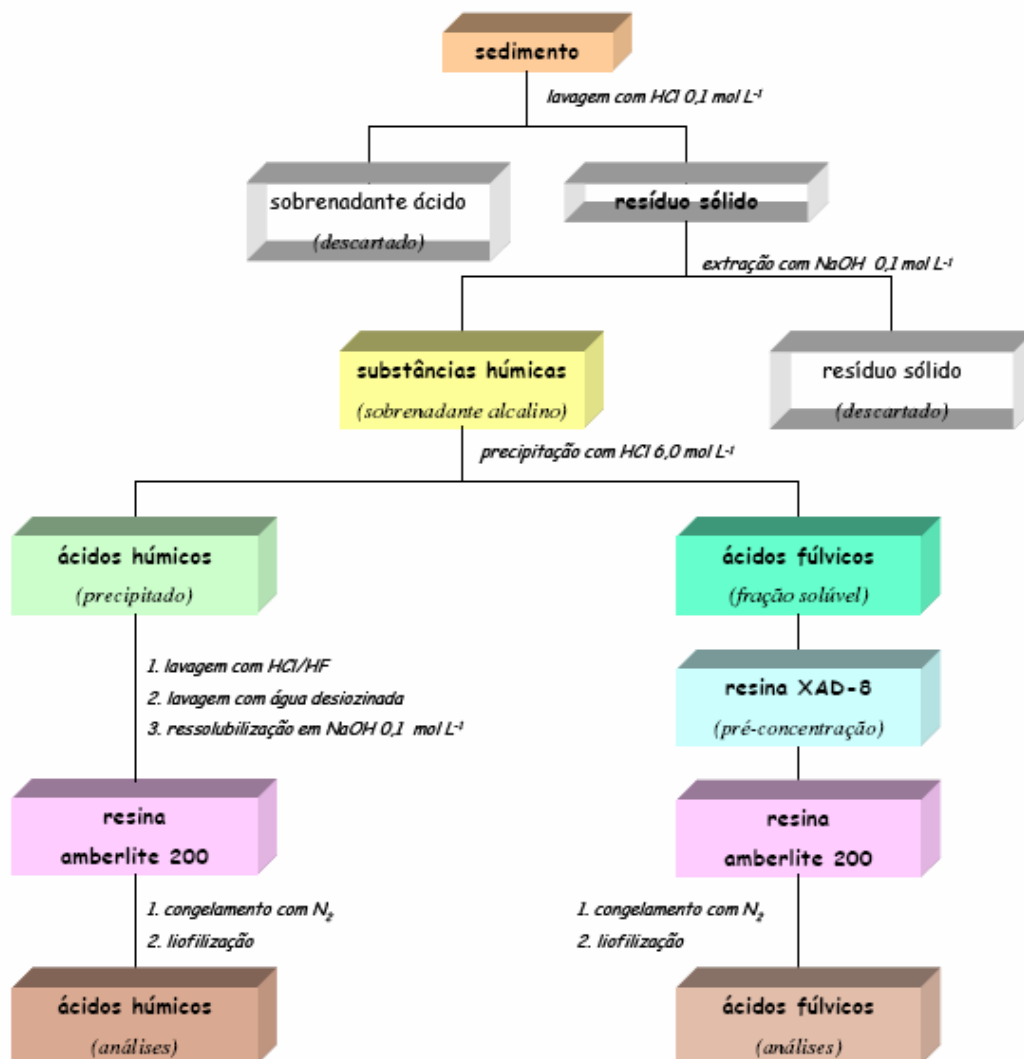


Figura 6: Etapas envolvidas no processo de extração e purificação das SH (AH e AF) .

3.2. Materiais

3.2.1. Reagentes e Solventes

Todos os reagentes e solventes utilizados neste trabalho foram de grau analítico. O metanol, cicloexano e hidróxido de sódio são provenientes da Vetec Química Fina Ltda, o pireno (98%) e o SDS (99%) da Sigma Aldrich.

A água utilizada foi deionizada e purificada em sistema Mili-Q (Milipore, Bedford, MA, EUA) com resistividade de 18 mQ.

3.3. Caracterização Elementar e Espectroscópica

A análise elementar dos AF e AH foi realizada em um Analisador Elementar Perkin Elmer, modelo 2400 – Analyzer, da Central de Análises do Departamento de Química da UFSC.

Os espectros de infravermelho dos AF e AH foram determinados em pastilha de KBr, entre 4000 e 800 cm^{-1} , e registrados em um Espectrofotômetro FT Perkin Elmer, modelo 16 PC.

Os espectros de absorção no UV-VIS das soluções de AF e AH foram registrados em um Espectrofotômetro Hewlett Packard, modelo 8452 A (banho Thermo Haake B 3).

3.4. Medidas de Fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência das soluções de AF e AH, foram registrados em um Espectrofluorímetro Perkin Elmer modelo LS-5B, à temperatura ambiente, utilizando uma cubeta de quartzo (3,0 mL).

3.5. Medidas de Tensão Superficial

As medidas de TS foram feitas num Tensiômetro Krüss, modelo K8, pelo método do anel (Pt-Ir, 20 nm) à temperatura ambiente. Todas as medidas foram feitas em duplicatas.

3.6. Preparo das Soluções de Substâncias Húmicas

- *Ácido Fúlvico*: 0,0461g (Horto 1) da amostra sólida, foram colocadas em um béquer com água, sob agitação durante 15 minutos, até completa dissolução. Transferiu-se este conteúdo para um balão volumétrico de 500 mL e completou-se o volume com água deionizada.
- *Ácidos Húmicos*: 0,0442g (Horto 1) e 0,0478g (Gran 7) das amostras sólidas, foram dissolvidas em um béquer, pela adição de pequenas quantidades da solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹, sob agitação durante 1 hora. Transferiu-se os conteúdos para balões volumétricos de 500 mL, completou-se o volume com água deionizada e mediu-se o pH que ficou na faixa de 8 à 9.

A partir das soluções estoque foram preparados 25 mL de soluções aquosas das SH nas seguintes concentrações: 0, 10, 20, 30, 40, 60 e 100 mg L⁻¹, para a medida do efeito da concentração na fluorescência das SH.

3.7. Determinação das Constantes de Associação SH – Pireno (K_{co})

Uma solução estoque de pireno (10⁻⁴ mol L⁻¹) foi preparada utilizando cicloexano como solvente.

Em balões volumétricos de 25 mL, foram adicionadas alíquotas de 25 µL da solução estoque de pireno (10⁻⁴ mol L⁻¹), de forma que a concentração final chegasse à 10⁻⁷ mol L⁻¹. Após a evaporação do cicloexano, foram adicionados aos balões volumes das soluções estoque de SH de forma que as concentrações finais fossem: 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 46, 52, e 60 mg L⁻¹, completando-se o volume com água deionizada. O pH das soluções foi ajustado na faixa de 5,5 - 6,0, com um pHmetro TEC2 da Technal, à temperatura ambiente.

Todas as soluções foram mantidas sob agitação constante durante 2 horas, antes de serem feitas as medidas de Fluorescência e UV-VIS.

3.8. Preparo das Soluções do Surfactante Dodecilsulfato de Sódio (SDS)

Foi preparada uma solução estoque de SDS (50 mmol L⁻¹) em água mili-Q.

A partir da solução estoque, foram preparadas 25 mL de soluções do SDS nas seguintes concentrações: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25 e 30 mmol L⁻¹.

Em seguida, em balões volumétricos de 25 mL foram adicionadas alíquotas de 25 µL da solução estoque de pireno em cicloexano (10^{-4} mol L $^{-1}$), de forma que a concentração final chegasse à 10^{-7} mol L $^{-1}$. Após a evaporação do cicloexano, foram adicionados aos balões, volumes da solução estoque de SDS de forma que as concentrações finais fossem: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, 25 e 30 mmol L $^{-1}$. Completou-se os volumes com água mili-Q, e deixou-se sob agitação durante 2 horas, antes de efetuar as medidas.

3.9. Parâmetros para as Medidas de Fluorescência das SH e SDS

- Nas medidas de variação da intensidade de fluorescência em função da concentração de SH foram utilizados os seguintes parâmetros: fendas de entrada e saída de luz de 5 e 10 nm, comprimentos de onda de excitação (λ_{exc}) de 313 nm e faixa de monitoramento entre 350 à 600 nm.
- Para as medidas de fluorescência na determinação das constantes de associação SH – Pireno foram utilizados os seguintes parâmetros: fendas de entrada e saída de luz de 5 nm, comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 334 nm e o monitoramento entre 350 à 450 nm (Engelbrecht e von Wandruszka, 1998; Sierra *et al.*, 2001).
- Para as medidas de fluorescência nas soluções de SDS com pireno foram utilizadas: fendas de entrada e saída de luz de 2,5 nm, comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 334 nm e faixa de monitoramento entre 350 à 450 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise Elementar

As SH são constituídas principalmente de carbono, hidrogênio, oxigênio, enxofre e fósforo, sendo carbono e oxigênio os mais abundantes, seguidos de hidrogênio e nitrogênio. O conteúdo de enxofre varia desde quantidades traço até algumas unidades por cento, dependendo da origem das amostras, já o conteúdo de fósforo é muito baixo (Rashid, 1985).

Na tabela 1, encontram-se os dados referentes à composição elementar das amostras de AF e AH, estudadas neste trabalho.

Tabela 1: Análise Elementar das SH estudadas.

Amostras	C (%)	H (%)	N (%)	H/C	N/C
AF Horto 1	41,2	3,93	1,89	1,13	0,04
AH Horto 1	43,8	4,55	3,49	1,24	0,07
AH Horto 2	45,4	4,47	3,61	1,17	0,07
AH Gran 7	34,0	4,38	2,63	1,53	0,06

$$H/C = [(\%H / \%C) * 12,011] / 1,00794$$

$$N/C = [(\%N / \%C) * 12,011] / 14,0067$$

A composição elementar das SH, bem como a relação entre seus elementos, dependem da fonte de MO, do grau de humificação e das condições ambientais nas quais as SH se formaram. Geralmente as quantidades de carbono, hidrogênio e nitrogênio são maiores para os AH do que para os AF. Como consequência, os AF são solúveis em qualquer pH, apresentam baixa massa molar, são menos polimerizados que os AH e mais ricos em grupos funcionais oxigenados (Rashid, 1985).

Os dados da tabela 1, mostram efetivamente, esta tendência, ou seja, comparando-se os percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio dos AF e AH de solo, os primeiros apresentam os menores valores.

O AH de estuário, por outro lado, apresenta valores menores que àqueles dos AHs de solo. A influência da matéria orgânica de origem aquática, sendo esta, mais

alifática, mais proteica e menos rica em derivados lignínicos, é evidenciada nesta amostra.

As relações entre H/C e N/C têm sido utilizadas para determinar a fonte de MO, o grau de condensação, as transformações diagenéticas e as condições ambientais que as SH se formaram. Segundo Rice e MacCarthy (1991), o grau de alifaticidade das SH decresce de acordo com a ordem: marinho > água doce > solo. Isto acontece porque a MO proveniente do solo, contém derivados de lignina, que são predominantes nos ambientes terrestres (Sierra *et al.*, 2002). O maior valor da relação H/C para a amostra de estuário, confirma esta tendência.

4.2. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de Infravermelho (IV) é um método bastante utilizado nas análises de SH, pois permite a identificação dos grupos funcionais presentes.

Na figura 7, encontram-se os espectros de Infravermelho das amostras de AF e AH estudadas neste trabalho. O espectro da amostra de estuário (AH Horto 2) não foi mostrado, pois apresentou bandas com muito ruído.

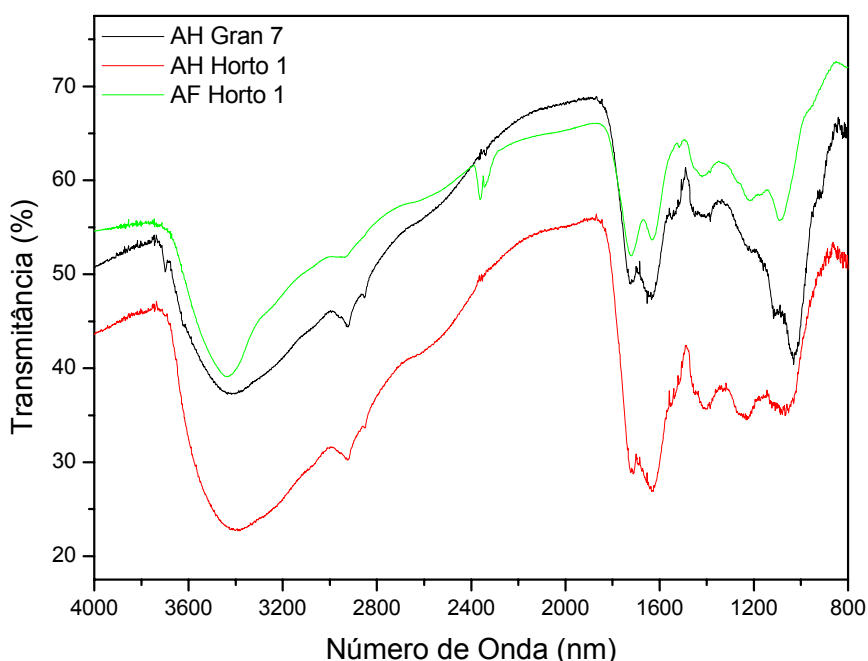


Figura 7: Espectros de Infravermelho para as amostras de AH e AF estudadas.

Os espectros de Infravermelho das SH apresentam bandas intensas na região de 3400 à 3300 cm^{-1} , devido a presença de grupos funcionais oxigenados de álcoois e fenóis. Em 2940 à 2840 cm^{-1} encontram-se dois picos referente à estiramentos característicos de grupos $-\text{CH}_2-$ de hidrocarbonetos alifáticos e cíclicos. Estes estiramentos são mais evidentes nos AH do que nos AF, devido a maior presença de cadeias alifáticas nestes (Sierra *et al.*, 2004).

Na região de 1720 cm^{-1} as vibrações existentes são devido ao estiramento axial de C=O de ácidos carboxílicos e cetonas, e é mais intensa nos AF do que nos AH, pois o AF tem um conteúdo de grupos carboxílicos mais elevado.

Em 1640 cm^{-1} , a banda dos AH se localiza em maiores frequências do que os AF. Os grupos responsáveis por este estiramento são: C=C de anél aromático, C=O de amidas e N-H (Sierra *et al.*, 2004).

Em 1280 à 1220 cm^{-1} são observadas bandas relativas ao estiramento axial de C-O e deformação angular de O-H de grupos ácidos. Estes estiramentos são encontrados para os AF e para os AH.

4.3. Espectroscopia de Fluorescência

Segundo Senesi (1990), os espectros de emissão de fluorescência das SH apresentam, em geral, uma única banda cujo máximo muda em função do comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) utilizado. Os AF apresentam normalmente máximos de emissão de fluorescência entre 410 e 490 nm (para λ_{exc} situados entre 310 e 370 nm), enquanto que os AH apresentam máximos de emissão de fluorescência na faixa de 450 à 520 nm, para estes mesmos λ_{exc} . No que se refere a intensidade, as SH provenientes de ambientes tipicamente terrestres são muito mais fluorescentes do que as amostras de ambientes aquáticos, certamente por causa da concentração relativa de fluoróforos presentes nas estruturas das primeiras.

A identificação exata dos fluoróforos responsáveis pela fluorescência das SH ainda não foi realizada. O espectro de fluorescência das SH e das águas naturais é, provavelmente o resultado da contribuição simultânea dos espectros de vários fluoróforos diferentes.

De fato, as propriedades de fluorescência das SH em solução dependem de um grande número de fatores, como: origem, massa molar, concentração, pH, força iônica, temperatura, entre outros.

Neste trabalho, foi avaliado o efeito da concentração na fluorescência das SH em solução aquosa.

Nas figuras 8, 10 e 12 estão mostrados os espectros de emissão de fluorescência das amostras estudadas, em diferentes concentrações. Nas figuras 9, 11 e 13 mostra-se a relação entre a intensidade de fluorescência medida no máximo de emissão, e os respectivos comprimentos de onda, em diferentes concentrações.

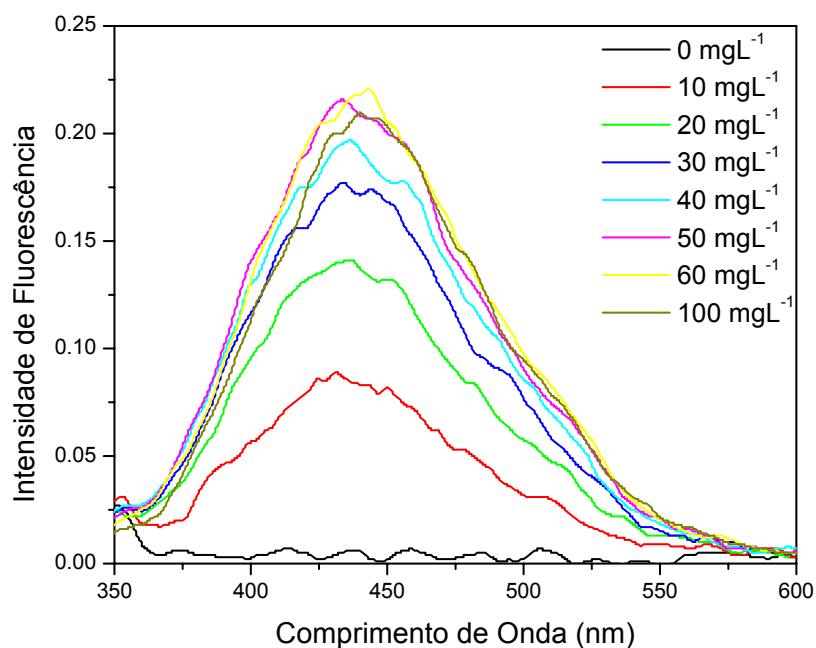


Figura 8: Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 313 \text{ nm}$) para a amostra AF Horto1, em diferentes concentrações.

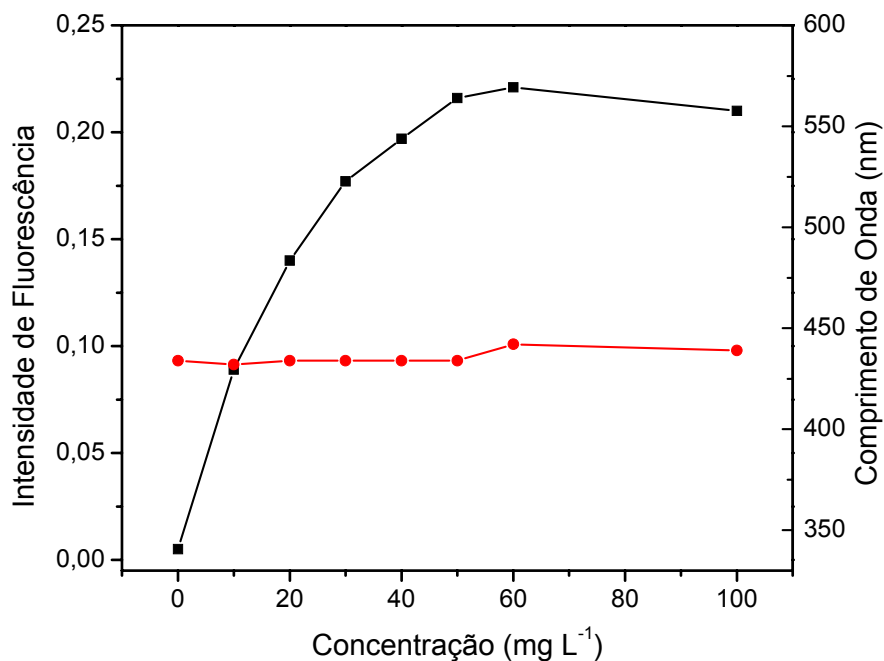


Figura 9: Variação da intensidade de fluorescência e do $\lambda_{m\acute{a}x}$ em função da concentração, para a amostra AF Horto 1. ■ Intensidade de Fluorescência ● Comprimento de Onda.

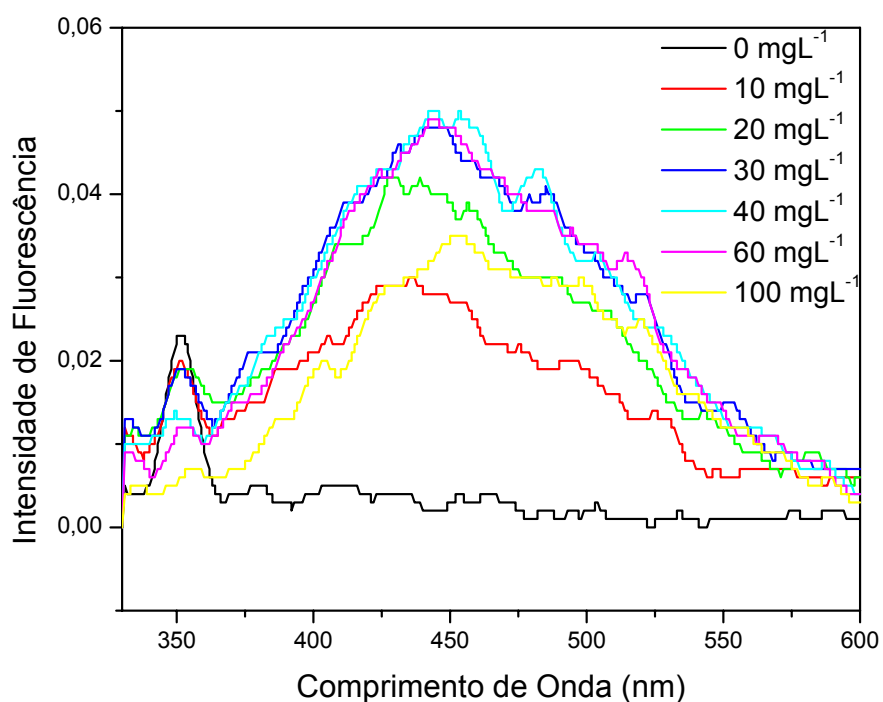


Figura 10: Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 313 \text{ nm}$) para a amostra AH Horto1, em diferentes concentrações.

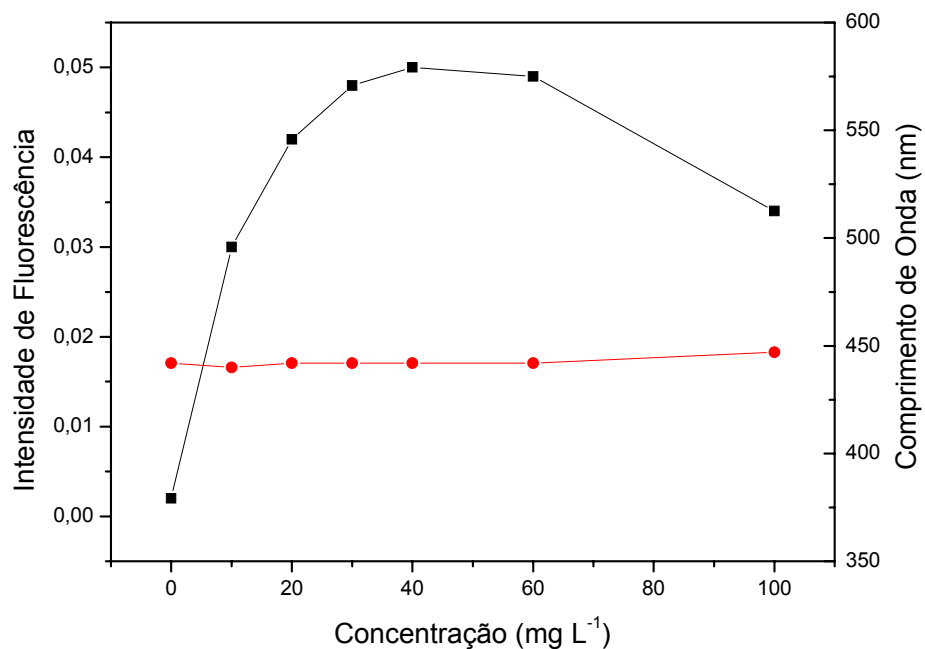


Figura 11: Variação da intensidade de fluorescência e do $\lambda_{m\acute{a}x}$ em função da concentração, para a amostra AH Horto 1. ■ Intensidade de Fluorescência ● Comprimento de Onda.

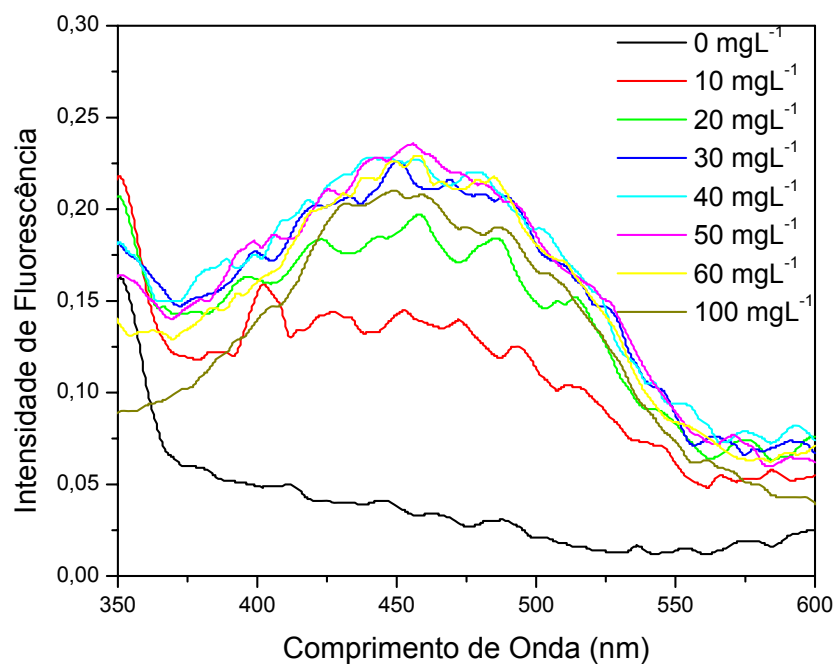


Figura 12: Espectros de emissão de fluorescência ($\lambda_{exc} = 313 \text{ nm}$) para a amostra AH Gran7, em diferentes concentrações.

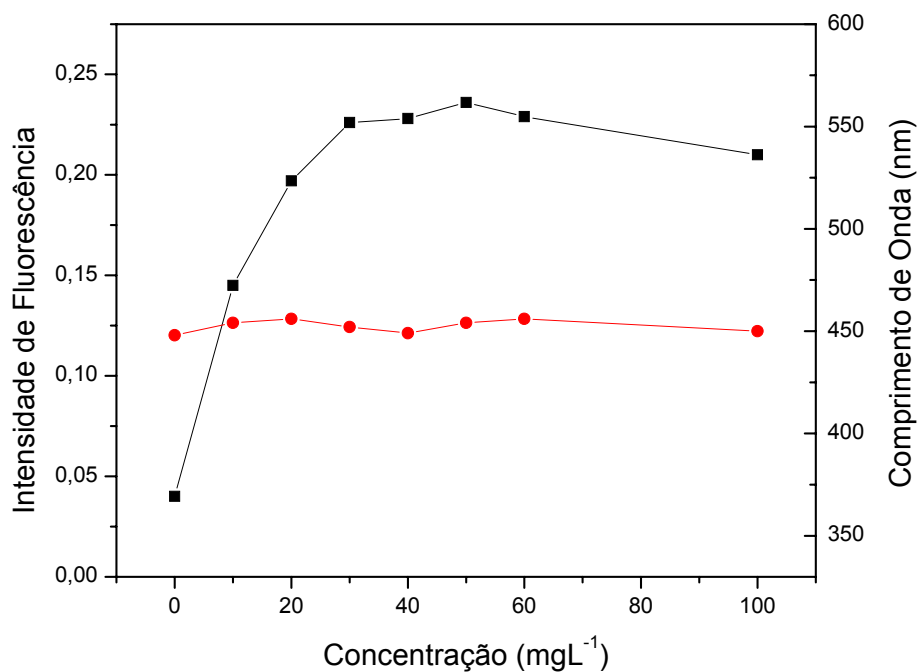


Figura 13: Variação da intensidade de fluorescência e do $\lambda_{m\acute{a}x}$ em função da concentração, para a amostra AH Gran 7. ■ Intensidade de Fluorescência ● Comprimento de Onda.

Conforme mostrado nas figuras, em baixos valores de concentração, a intensidade de fluorescência é proporcional ao aumento da concentração das SH. Em valores de concentrações mais altos, a intensidade de fluorescência tende a ficar constante e até diminuir. Este comportamento ocorre devido ao chamado *inner-filter-effect* (efeito de filtro interno) que é consequência da: a) Absorção de parte da radiação incidente, antes que ela alcance o ponto onde a luminescência é observada (meio da cubeta); b) Reabsorção de parte da fluorescência emitida antes que este deixe a cubeta. O primeiro efeito é chamado de efeito de filtro interno primário e o segundo, secundário.

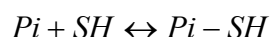
Por causa destes fenômenos, a fluorescência observada (F_{obs}) depende da absorção nos comprimentos de onda de emissão e de excitação (Kubista, 1994), não sendo uma função linear da concentração do fluoróforo.

No caso das SH, a linearidade só é válida abaixo da concentração de aproximadamente 40 mg L⁻¹.

O comprimento de onda máximo ($\lambda_{m\acute{a}x}$) por outro lado, não sofre variações significativas na faixa de concentrações estudadas, permanecendo aproximadamente em 430 nm para os AF e em 445 nm para as amostras de AH.

4.4. Constantes de Associação SH – Pireno

Para quantificar as interações SH – Pireno, foi utilizada a técnica de supressão de fluorescência (SF). Esta técnica é baseada no fato de que a intensidade de fluorescência do pireno é proporcionalmente decrescida com a adição de SH (Gauthier *et al.*, 1986). O equilíbrio da associação SH – Pireno pode ser representado por:



Onde o pireno (Pi) fluoresce muito e a SH pouco, formando um “complexo” (Pi – SH), que por sua vez, fluoresce menos que o pireno e mais que a SH. A constante de equilíbrio (K_b) para este processo é:

$$K_b = \frac{[Pi - SH]}{[Pi] \times [SH]}$$

E pode ser determinada pela representação de $F_{\text{corr(initial)}}/F_{\text{corr}}$ *versus* a concentração de SH (equação 5), sendo que a constante K_b é dada pelo coeficiente angular da reta. A constante é então normalizada ao conteúdo de carbono orgânico (CO) e denominada K_{CO} .

A intensidade de fluorescência do pireno foi medida na banda de maior intensidade (I).

Na figura 14 são mostrados os espectros de fluorescência do pireno em presença da amostra de AH de estuário (Gran 7).

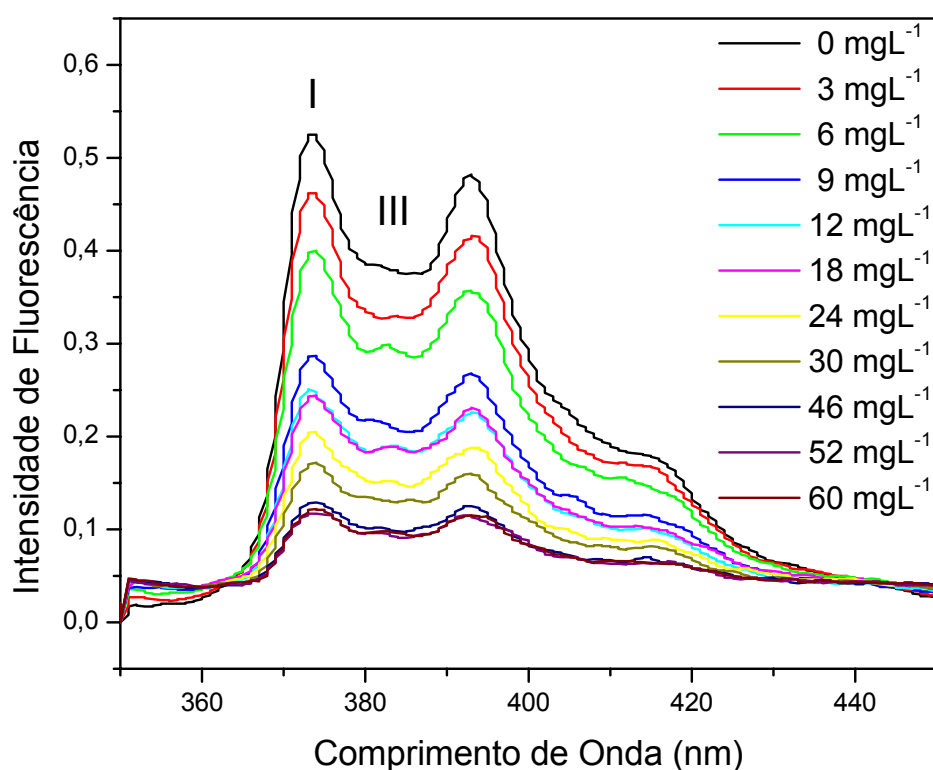


Figura 14: Espectro de SF do pireno (10^{-7} mol L⁻¹) na presença de AH Gran7.

Em água pura, a fluorescência do pireno é máxima. Na medida em que a concentração de AH aumenta, a intensidade de fluorescência diminui. Considerando este efeito, como resultante do *quenching* estático, onde há a formação de um “complexo” Pi - SH, menos fluorescente que o pireno, usa-se a constante de Stern – Volmer (equação 5) para determinar K_b .

Na tabela 2, encontram-se os dados relativos à interação do pireno com o AH de estuário.

Tabela 2: Interação do Pireno com AH Gran 7 (estuário).

[AH] mg L ⁻¹	Abs _{ex}	Abs _{em}	F _{obs}	F _{corr}	CR _{EFI}	F _{corr} _{inical} / F _{corr}	%SF
0	0.0091	0.0055	0.5250	0.5205	0.9915	1.0000	0.0
3	0.0434	0.0307	0.4620	0.4487	0.9711	1.1601	13.8
6	0.0664	0.0443	0.4000	0.3820	0.9550	1.3626	26.6
9	0.0877	0.0581	0.2870	0.2701	0.9410	1.9273	48.1
12	0.1108	0.0727	0.2480	0.2296	0.9257	2.2674	55.9
18	0.1623	0.1062	0.2440	0.2177	0.8921	2.3913	58.2
24	0.2108	0.1375	0.2050	0.1764	0.8605	2.9508	66.1
30	0.2550	0.1668	0.1720	0.1432	0.8324	3.6354	72.5
46	0.3450	0.2259	0.1290	0.1000	0.7756	5.2026	80.8
52	0.3520	0.2305	0.1170	0.0902	0.7713	5.7683	82.7
60	0.3625	0.2383	0.1220	0.0934	0.7652	5.5757	82.1

O CR_{EFI} é o fator de correção aplicado ao F_{obs}.

Com os dados da tabela 2, pode-se observar, um aumento nas absorbâncias da solução com o aumento da concentração de AH, tanto para o comprimento de onda de excitação (334 nm) quanto para o de emissão (373 nm). A leitura da F_{obs} é feita diretamente no espectro e é necessário a correção dos valores (EFI), para que seja possível a determinação real da intensidade de fluorescência do pireno no meio. A fluorescência observada foi corrigida pelo efeito de filtro interno, usando-se a equação 6.

$$\frac{F_{corr}}{F_{obs}} = \frac{2,3dA_{ex}}{1-10^{dA_{ex}}} * 10^{gA_{em}} * \frac{2,3SA_{em}}{1-10^{SA_{em}}}$$

Os parâmetros de correção utilizados foram: S = 12 cm; g = 0,39 cm e d = 1 cm (MacDonald *et al.*, 1997).

A figura 15 mostra a linearização de F_{corr} dada pela equação 5 para a amostra de AH de estuário (Gran 7).

As figuras e tabelas relativas às outras amostras, encontram-se em anexo.

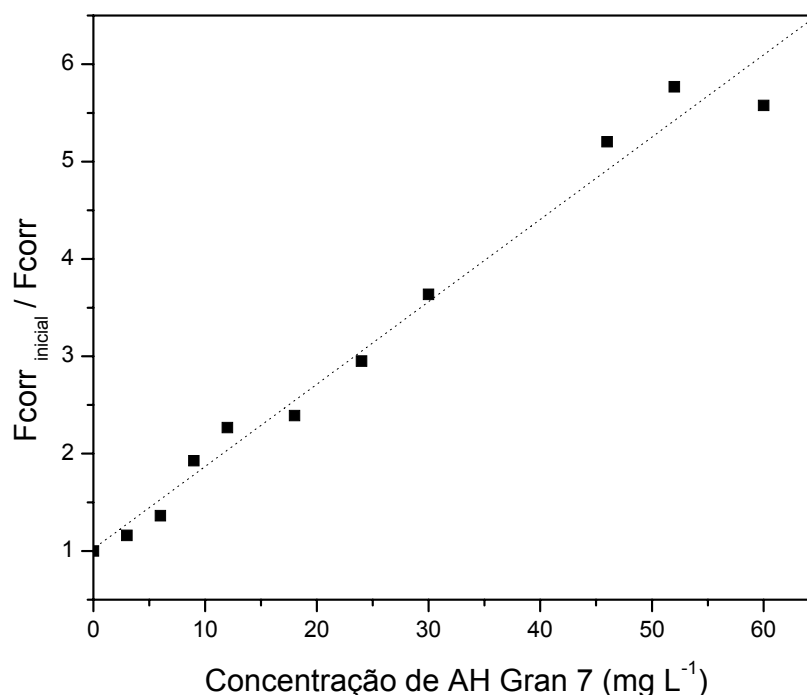


Figura 15: Gráfico de Stern – Volmer para o sistema Pireno - AH de estuário (Gran 7).

Na tabela 3 são mostrados os valores de K_b e K_{CO} para as amostras estudadas.

Tabela 3: Constantes de Associação entre o Pireno e as SH estudadas.

Amostra	K_b (L mg ⁻¹)	K_b (10 ⁴ mL g ⁻¹)	K_{co} (10 ⁴ mL g ⁻¹)
AH Gran 7	0,0845	8,45	24,83
AH Horto 1	0,0324	3,24	7,40
AH Horto 2	0,0157	1,57	3,46
AF Horto 1	0,0709	7,10	17,22

O AH de estuário (Gran 7) mostrou maior interação, ou seja, maior valor de K_{CO} , com o pireno que os AH de solo (Horto 1 e Horto 2). O AF mostrou um valor intermediário. Estes valores são comparáveis àqueles publicados por Gauthier *et al.*, (1987) que encontrou para AH de solo valores de K_{CO} entre 9 e 32 mL/g.

Estes dados podem indicar uma certa influência da alifaticidade e do

conteúdo de grupamentos ácidos nas interações SH – Pireno. Os AH de estuário, por sofrer influência da MO marinha, têm estas características mais acentuadas. Os AF são mais ricos em grupos carboxílicos que os AH (Giovanela, 1997).

As poucas amostras estudadas não permitem concluir de forma definitiva qual o papel da origem das SH na força das suas interações com o pireno. Além disso, pouco se sabe a respeito da natureza destas interações. Em trabalhos recentes, tem sido levantada a hipótese de que a supressão de fluorescência do pireno, por SH, seja consequência da inclusão do primeiro em ambientes hidrofóbicos (pseudo-micelas) gerados pelas SH em solução (Sierra *et al.*, 2005).

Para testar esta possibilidade, foram feitos experimentos com um surfactante conhecido (SDS), de forma a observar se haveria alguma similaridade no comportamento do pireno comparado às SH. Para isso, foram feitos espectros de fluorescência e tensão superficial do SDS com pireno e em água.

A figura 16 mostra a relação entre a fluorescência do pireno medida no pico de maior intensidade (373 nm) e a concentração de SDS.

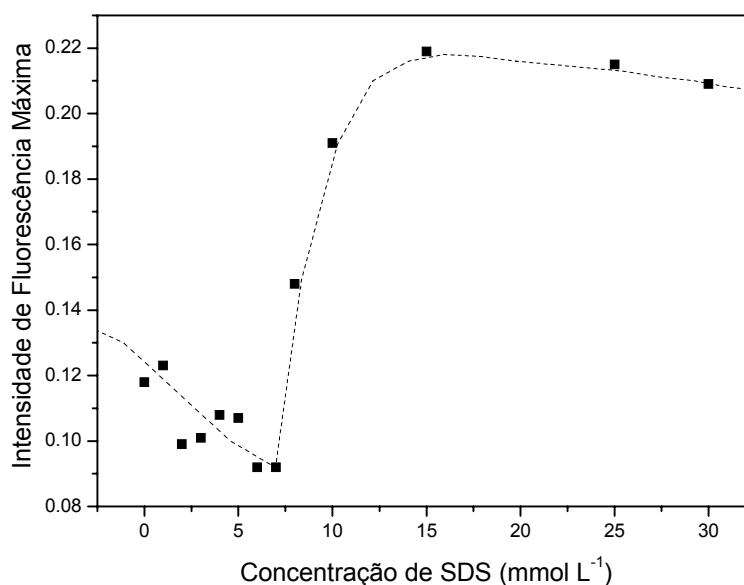


Figura 16: Intensidade de fluorescência do pireno (10^{-7} mol L⁻¹) em função da concentração de SDS.

O valor da CMC do SDS foi comprovado medindo-se a tensão superficial em diferentes concentrações de SDS em água (Figura 17).

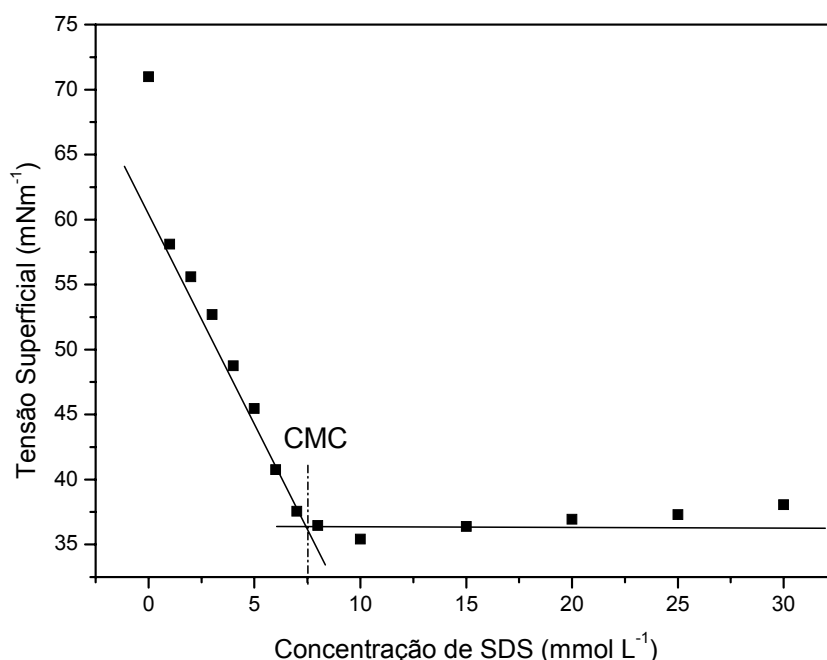


Figura 17: Determinação da CMC do SDS à temperatura ambiente.

Os dados da figura 16 mostram que em concentrações abaixo da CMC, o efeito da presença do surfactante SDS na fluorescência do pireno é similar àquele das SH, mas em menor grau. No caso do SDS, a diminuição provocada foi cerca de 25 % do valor inicial, enquanto que nas SH, esta diminuição chegou a aproximadamente 75 %. Acima da CMC, o significativo aumento da intensidade de fluorescência deve ser consequência da aglomeração de pireno nos ambientes micelares. Com base nestas informações, pode-se supor que o efeito das SH na fluorescência do pireno não esteja necessariamente ligado à inclusão deste em “micelas húmicas”, uma vez que isto provocaria, em princípio, um aumento e não uma diminuição da intensidade de fluorescência. No caso das SH, para verificar se haveria formação efetiva de micelas, seria necessário elevar muito a concentração, tornando inviável a solubilização. De qualquer modo, experimentos deste tipo não teriam interesse ambiental, uma vez que a concentração de SH em águas naturais quase nunca ultrapassa os 30 mg L⁻¹.

A pequena atenuação da fluorescência antes da CMC (Figura 16), pode ter origem em fenômenos similares nos dois tipos de sistema. Assim, nos dois casos,

esta atenuação parece ser consequência da aproximação, por interação hidrofóbica do pireno, com a porção apolar do surfactante ou da SH, gerando um “complexo” Pireno – Surfactante ou Pireno – SH, mais estável que o pireno livre em meio aquoso, e com menos possibilidades de transições eletrônicas que levem à emissão de fluorescência. Estas observações, serão o ponto de partida de estudos posteriores com outras amostras de SH e com outros tipos de surfactantes.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos experimentalmente, pode-se concluir que:

- A intensidade de fluorescência das SH em solução aquosa é função linear da concentração até aproximadamente 40 mg L^{-1} .
- A presença de SH em solução contendo pireno provoca a diminuição da intensidade de fluorescência deste. A supressão de fluorescência é proporcional à quantidade de SH e esta proporcionalidade permite determinar valores de constantes de associação (K_{CO}) entre pireno e SH. Os valores mudam de uma amostra para outra, mas permanecem em escalas comparáveis de grandeza.
- Experimentos com SDS levaram a supor que a supressão de fluorescência do pireno pelas SH não deve estar relacionada a inclusão destes em ambientes micelares, uma vez que isto provocaria um aumento, e não uma diminuição da intensidade de fluorescência.
- Abaixo da CMC, o aumento da concentração do surfactante SDS, provocou ligeira diminuição da fluorescência do pireno. Este efeito é similar àquele das SH.

Estudos com outros tipos de surfactantes e com diferentes amostras de SH, seriam interessantes para elucidar estes e outros pontos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHIN, Y. P.; AIKEN, R. G.; DANIELSEN, K. M. *Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances: The role of molecular weight and aromaticity. Environmental Science and Technology*, v. 31, p. 1630 - 1635, 1997.

CHIOU, C. T.; MALCOLM, R. L.; BRINTON, T. I.; KILE, D. E. *Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. Environmental Science and Technology*, v. 20, n.5, p. 502 - 508, 1986.

DONG, D. C.; WINNIK, M.A. *The py scale of solvent polarities. Solvent effects on the vibronic fine structure of pyrene fluorescence and empirical correlations with Et and Y values. Photochem. Photobiol.*, v. 35, p. 17 - 21, 1982.

GAUTHIER, T. D.; SHANE, E. C.; GUERIN, W. F., *et al. Fluorescence quenching method for determining equilibrium-constants for polycyclic aromatic-hydrocarbons binding to dissolved humic materials. Environmental Science and Technology*, v. 20(11), p. 1162 - 1166, 1986.

KUBISTA, M. *Experimental Correction for the Inner-filter-effect in Fluorescence Spectra. Analyst*, v. 119, p. 417 - 418, 1994.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Plenum Press, New York, p. 258 - 297, 1983.

MANIASSO, N. *Ambientes micelares em Química Analítica. Química Nova*, v. 24, n.1, p. 87 - 93, 2001.

MONTENEGRO, L.; DOMINGUEZ, A., *et al. Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques. Jornal of Chemical Education*, v. 74, p. 1227 - 1231, 1997.

RAUEN, T. G. BEBACHER, N. A.; SIERRA, M. M. D. *Tensoatividade de ácidos*

húmicos de procedências distintas. Química Nova, v. 25, p. 909 - 913, 2002.

RAUEN, T.G. *Estudo, por tensão superficial e fluorescência, das propriedades surfactantes das substâncias húmicas e sua influência na solubilidade de HPAs em meio aquoso*. 2005, p. 1 - 18. **Tese** (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

REBHUN, M.; MEIR, S.; LAOR, Y. *Using dissolved humic acid to remove hydrophobic contaminants from water by complexation-flocculation process*. **Environmental science and technology**, v. 32, p. 981 - 986, 1998.

RESENDE, M.O. *Grupos funcionais das substâncias húmicas ativos na complexação de metais e pesticidas*. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2, 1997, São Carlos: EMBRAPA-CNPDIA, 1997, 207 P., P. 63 - 65.

REICHARDT, C. *Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators*. **Chem. Rev.**, v. 94, p. 2319 - 2358, 1994.

SAAR, R. A.; WEBER, J. H. *Fulvic acid: modifier of metal-ion chemistry*. **Environmental Science and Technology**, v. 16, p. 866 - 872, 1982.

SCOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª edição, Porto Alegre, p. 322 - 341, 2002.

SEIN, L.T.; VARNUM, J.M.; JANSEN, S.A. *Conformational modeling of a new building block of humic acid: Approaches to the lowest energy conformer*. **Environmental Science and Technology**, v. 33, p. 546, 1999.

SENESI, N.; FELICI, M. *Interazioni tra sostanza orgânica e pesticid*. In: NANNIPIERI, P. (Ed) **Ciclo della sostanza orgânica nel suolo**. Bologna: Patron Editore, p. 197 - 238, 1990.

SIERRA, M. M. D; GIOVANELA, M. *A utilização da espectroscopia de*

fluorescência no estudo da matéria orgânica dissolvida nas águas naturais: Evolução e Perspectivas. Química Nova, v.19 , p. 294 – 300, 1996.

SIERRA, M. M. D.; GIOVANELA, M.; SORIANO - SIERRA, E.J. *Fluorescent properties of well-characterized sedimentary estuarine humic compounds and surrounding pore waters. Environmental Technology*, v. 21, p. 979 - 988, 2000.

SIERRA, M. M. D.; RAUEN, T, G.; TORMEN, L.; DEBACHER, N. A.; SORIANO – SIERRA, E, J. *Evidence from surface tension and fluorescence data of a pyrene-assisted micelle-like assemblage of humic substances. Water Research*, v. 39, p. 3811 – 3818, 2005.

TANAKA, S.; OBA, K.; FUKUSHINA, M.; NAKAYASU, K.; HASEBE, K. *Water solubility enhancement of pyrene in the presence of humic substances. Analytical Chimica Acta*, p. 351 - 357, 1997.

TAVARES, M.C.H.; LANDGRAF, M.D.; VIEIRA, E.M.; REZENDE, M.O.O. *Estudo da adsorção-dessorção da trifluralina em solo e em ácido húmico. Química Nova*, v. 19, p.605 - 608, 1996.

TORMEN, L. *Extração, Caracterização de Substâncias Húmicas e Avaliação da Capacidade em Agregar Pireno em Meio Aquoso*. 2005, p. 8 - 12. **Trabalho de Conclusão de Curso** – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

VISSER, S. A.; CAILLIER, M. *Observations on the dispersion and aggregation of clays by humic substances. Geoderma*, v. 42, p. 331, 1998.

YATES, L. M.; ENGEBRETSON, R. R.; HAAKENSEN, T. J.; von WANDRUSZKA, R. *Immobilization of aqueous pyrene by dissolved humic acid. Analytica Chimica Acta*, v. 356, p. 295 - 300, 1997.

7. ANEXOS

a. Medidas de Fluorescência para a amostra de solo (AH Horto 1).

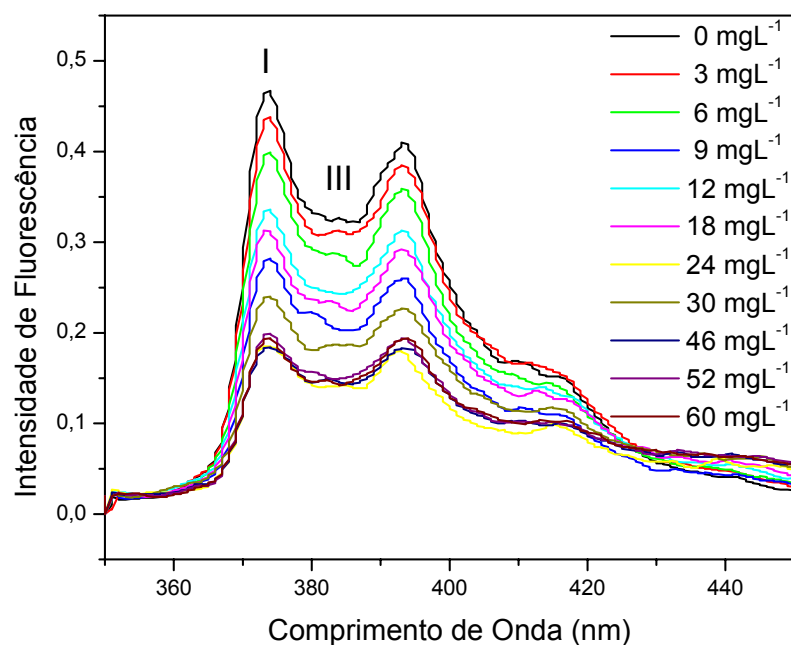


Figura 18: SF do pireno (10^{-7} mol L $^{-1}$) na presença de AH Horto 1 (0 à 60 mg L $^{-1}$).

Tabela 4: Interação do Pireno com AH Horto 1.

[AH] mg L $^{-1}$	Abs _{ex}	Abs _{em}	F _{obs}	F _{corr}	CR _{EFI}	F _{corr} _{inicial} / F _{corr}	%SF
0	0.00543	0.0028	0.4670	0.4640	0.9936	1.0000	0.0
3	0.02689	0.0169	0.4380	0.4291	0.9797	1.0814	7.5
6	0.04543	0.0282	0.3990	0.3858	0.9670	1.2027	16.9
9	0.05893	0.0373	0.2820	0.2703	0.9583	1.7170	41.8
12	0.07414	0.0458	0.3360	0.3183	0.9474	1.4576	31.4
18	0.10082	0.0622	0.3120	0.2899	0.9293	1.6004	37.5
30	0.15541	0.0964	0.2400	0.2143	0.8929	2.1653	53.8
46	0.20763	0.1278	0.1840	0.1578	0.8575	2.9411	66.0
52	0.20314	0.1238	0.1990	0.1711	0.8596	2.7125	63.1
60	0.21086	0.1303	0.1940	0.1660	0.8557	2.7952	64.2

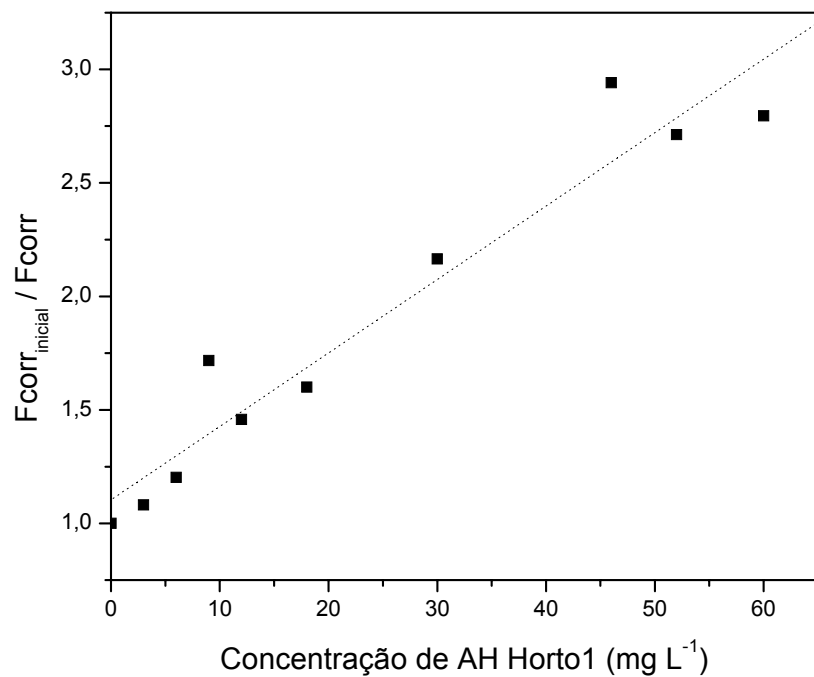


Figura 19: Gráfico de Stern – Volmer para o sistema Pireno - AH de solo (Horto 1).

b. Medidas de Fluorescência para a amostra de solo (AH Horto 2).

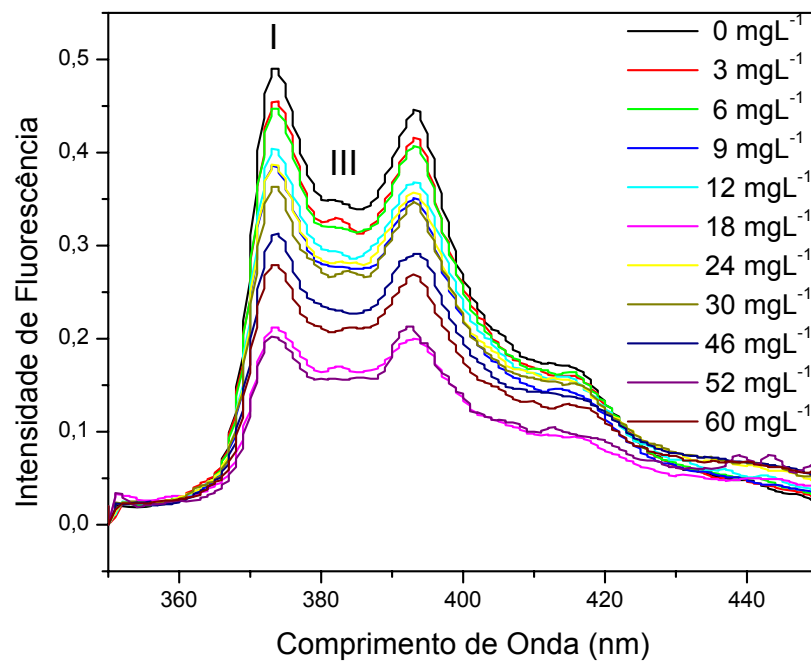


Figura 20: SF do pireno ($10^{-7}\ mol\ L^{-1}$) na presença de AH Horto 2 (0 à $60\ mg\ L^{-1}$).

Tabela 5: Interação do Pireno com AH Horto 2.

[AH] mg L ⁻¹	Abs _{ex}	Abs _{em}	F _{obs}	F _{corr}	CR _{EFI}	F _{corr} _{inicial} / F _{corr}	%SF
0	0.0166	0.0089	0.4900	0.4829	0.9854	1.0000	0.0
3	0.0284	0.0165	0.4540	0.4438	0.9776	1.0879	8.1
6	0.0417	0.0254	0.4470	0.4332	0.9691	1.1146	10.3
9	0.0662	0.0436	0.3860	0.3685	0.9548	1.3102	23.7
12	0.0712	0.0465	0.4040	0.3843	0.9513	1.2564	20.4
24	0.1263	0.0825	0.3870	0.3542	0.9153	1.3631	26.6
30	0.1494	0.0979	0.3630	0.3269	0.9005	1.4772	32.3
46	0.1889	0.1239	0.3110	0.2721	0.8750	1.7743	43.6
60	0.2087	0.1397	0.2790	0.2411	0.8641	2.0027	50.1

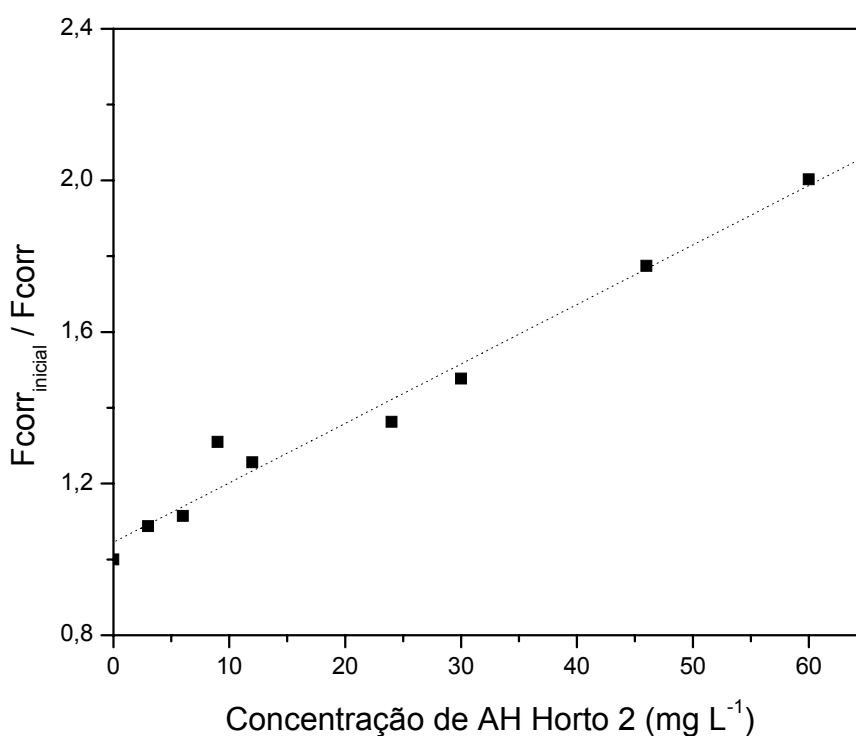


Figura 21: Gráfico de Stern – Volmer para o sistema Pireno - AH de solo (Horto 2).

c. Medidas de Fluorescência para a amostra de solo (AF Horto 1).

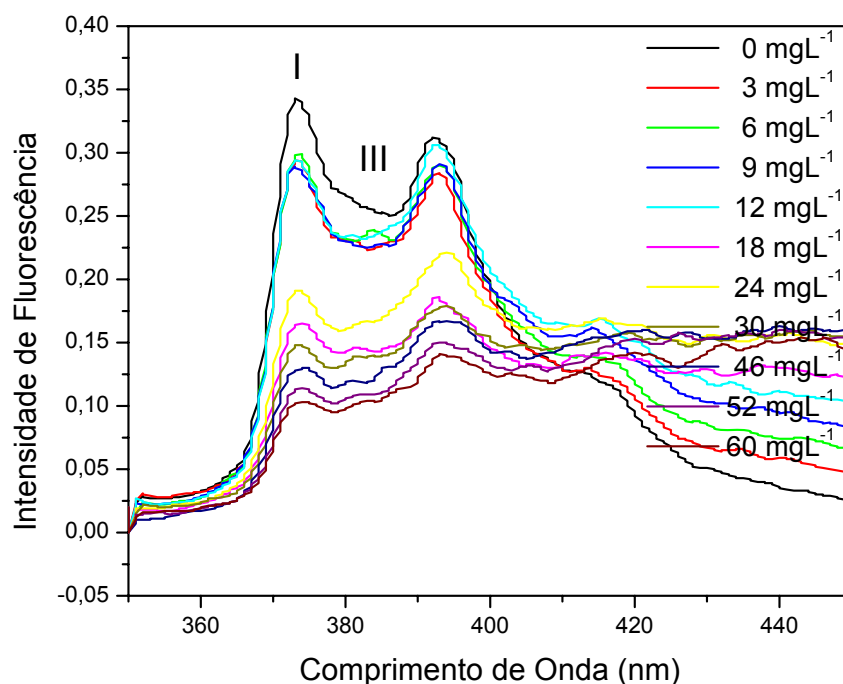


Figura 22: SF do pireno (10^{-7} mol L $^{-1}$) na presença de AF Horto 1 (0 à 60 mg L $^{-1}$).

Tabela 6: Interação do Pireno com AF Horto 1.

[AH] mg L $^{-1}$	Abs _{ex}	Abs _{em}	F _{obs}	F _{corr}	CR _{EFI}	F _{corr} _{inicial} / F _{corr}	%SF
0	0.01831	0.0115	0.3400	0.3351	0.9855	1.0000	0.0
3	0.04893	0.0302	0.2930	0.2826	0.9645	1.1857	15.7
6	0.07707	0.0454	0.2990	0.2822	0.9438	1.1873	15.8
9	0.10661	0.0623	0.2860	0.2640	0.9230	1.2693	21.2
12	0.13802	0.0818	0.2930	0.2643	0.9019	1.2679	21.1
18	0.22386	0.1316	0.1650	0.1391	0.8428	2.4095	58.5
24	0.30585	0.1800	0.1910	0.1505	0.7880	2.2262	55.1
30	0.40332	0.2438	0.1480	0.1078	0.7282	3.1090	67.8
46	0.49173	0.2873	0.1290	0.0862	0.6682	3.8873	74.3
52	0.52385	0.3093	0.1140	0.0741	0.6502	4.5206	77.9
60	0.56668	0.3418	0.1030	0.0647	0.6280	5.1802	80.7

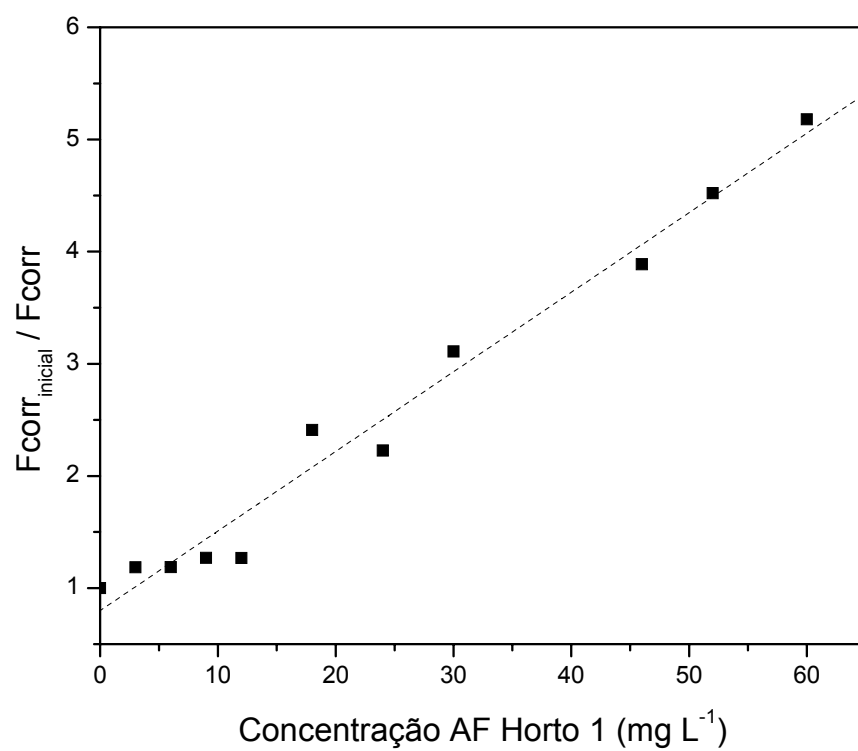


Figura 23: Gráfico de Stern – Volmer para o sistema Pireno - AF de solo (Horto 1).